

**IMMUNELEKTROPHORETISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR ORGANSPEZIFITÄT
VON MENSCHLICHEN HERZMUSKELPROTEINEN
IM VERGLEICH ZU MENSCHLICHEN
SKELETTMUSKEL- UND LEBERPROTEINEN**

Dagmar Lieselotte van Thiel

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546706_0040

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. N. Zöllner

IMMUNELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR
ORGANSPEZIFITÄT VON MENSCHLICHEN HERZMUSKELPROTEINEN
IM VERGLEICH ZU
MENSCHLICHEN SKELETTMUSKEL- UND LEBERPROTEINEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dagmar Lieselotte vanThiel
aus
Stockdorf/Obb.

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Nowy

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.7.1975



Einleitung

I. Mutter und Väter

1. Mutter

a) Die Kindheit

b) Die Jugend

c) Die Ehe

d) Die Kinder

e) Die Eltern

f) Die Zukunft

Meiner Mutter und meinem Vater

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

1. Die Mutter

2. Der Vater

3. Die Ehe

4. Die Kinder

5. Die Eltern

6. Die Zukunft

7. Die Liebe

8. Die Dankbarkeit

9. Die Hoffnung

10. Die Geduld

11. Die Frömmigkeit

12. Die Gerechtigkeit

13. Die Barmherzigkeit

14. Die Güte

15. Die Sanftmut

16. Die Keuschheit

17. Die Feindschaft

18. Die Eifersucht

19. Die Neid

20. Die Habsucht

21. Die Wut

22. Die Traurigkeit

23. Die Verzweiflung

24. Die Selbsterlöschung

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	5
A. Material	5
1) Der Herzmuskelextrakt	5
2) Die Antigenkomponenten des Herzmuskelextraktes	6
3) Der Skelettmuskelextrakt und der Leberextrakt	8
4) Die Antigenkomponenten des Skelettmuskel- und des Lebergewebeextraktes	10
5) Die Antisera	12
B. Methoden	13
1) Die Immunelektrophorese	13
2) Weitere verwendete Methoden	19
a) Die Zonenelektrophorese auf Zelluloseazetatfolie	19
b) Die kontinuierliche präparative Papierelektrophorese	21
III. Eigene Untersuchungen und ihre Ergebnisse	24
A. Die Immunelektrophorese einer Gruppe von menschlichen Herzmuskelproteinen und Antisera von Kaninchen	24
B. Die Zonenelektrophorese und Immunelektrophorese mit einer Gruppe von menschlichen Skelettmuskelproteinen	27
1) Ergebnis der Zonenelektrophorese	28
2) Ergebnis der Immunelektrophorese	29

	Seite
C. Die Zonenelektrophorese und Immunelektrophorese mit einer Proteingruppe des menschlichen Lebergewebeextraktes	31
1) Ergebnis der Zonenelektrophorese	32
2) Ergebnis der Immunelektrophorese	32
D. Vergleich der Elektropherogramme der drei Organextrakte	34
E. Besprechung der Ergebnisse	40
IV. Diskussion	42
V. Zusammenfassung	52

I. EINLEITUNG

Der Nachweis und die Untersuchung von gewebespezifischen Antigenen und Antikörpern sowie ihrer Reaktionsweise ist heute aus verschiedenen Aspekten der praktischen und experimentellen Medizin von Interesse. Besondere Bedeutung haben diese Untersuchungen für die Transplantationsmedizin, die Tumorforschung und die Klärung von Ätiologie und Pathogenese sowie für die Diagnostik der Autoaggressionskrankheiten. Im weiteren Interessenbereich liegen Erkrankungen, für deren Frühdiagnose und Verlaufskontrolle immunchemische Untersuchungen von Wichtigkeit sein können, wie z.B. der Herzinfarkt. Das Ziel aller diesbezüglichen wissenschaftlichen und klinischen Untersuchungen ist u.a. die Beantwortung der Frage, inwieweit immunbiologische Mechanismen bzw. Autoimmunprozesse bei pathologischen Reaktionen eine Rolle spielen - wie z.B. bei der Abstoßung eines Transplantats oder der Entstehung einer Organerkrankung -, um schließlich auf der Basis dieser Erkenntnisse unsere diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten erweitern zu können. Gerade für die Pathogenese und - bzw. oder - den Verlauf zahlreicher Erkrankungen des Herzens werden (Auto-)Immunprozesse verantwortlich gemacht, bzw. diskutiert (46, 27, 10, 48). Das sind hauptsächlich die rheumatischen Herzerkrankungen (46, 27, 10, 7, 32, 6, 22); aber auch die Syndrome, die nach Herzläsionen als sog. Postkardiotomie-, Postkommissurotomie- und Postmyokardinfarkt-Syndrom auftreten (30, 10, 27, 22, 6, 12); oder andere Kardiopathien wie die Endomyo-

kardfibrose, das Rheumatoide-Arthritis-Herz, die Disseminierte-Lupus-Myokarditis und Kardiopathien mit Periarteriitis nodosa oder mit eosinophiler Myokarditis (10). Auch beim Myokardinfarkt (30, 6, 34) und selbst bei der chronischen Koronarinsuffizienz wurde schon nach immunbiologischen Hintergründen geforscht, die hinsichtlich Verlauf und besonders Diagnose dieser Erkrankungen Bedeutung haben können (6, 48).

Um nachzuweisen, daß immunbiologische Prozesse solche Krankheiten hervorrufen oder ihren Verlauf beeinflussen, wurde immer wieder - zum Teil mit Erfolg - versucht, zirkulierende Antikörper gegen Herzgewebe im Serum von Patienten aufzufinden. Als erste entdeckten 1937 BROKMAN und Mitarb. (6) im Serum von Kindern mit akutem rheumatischem Fieber Antikörper, die gegen Herzgewebe gerichtet waren und zwar mittels der Komplementbindungsreaktion. Auch CAVELTI berichtete 1945 (7) über die Anwesenheit zirkulierender Autoantikörper in Fällen von Herzerkrankungen. Er verwendete die Kollodiumpartikel-Agglutination als Nachweismethode wie später auch WAGNER und REJHOLEC (43). Weitere Untersuchungen wurden mit dem Hämagglutinations-Test, mit der Gelpräzipitation (11), mit dem Antihumanglobulin-Konsumptionstest (42) und der Immunfluoreszenz (29) durchgeführt. Keiner der Untersucher konnte jedoch die Herzspezifität der gefundenen Antikörper nachweisen. Dies gelang erst KAPLAN 1959 (30) und 1960 (31) mittels der Immunfluoreszenz, der Komplementbindungsreaktion und der Kapillarflockungsreaktion. Den Nachweis eines Serumfaktors mit den Eigenschaf-

ten eines homologen Herzgewebe-Antikörpers erbrachten 1960 KLEINSORGE und DORNBUSCH mit der indirekten Hämagglutination (34).

Gleichzeitig veröffentlichte die Gruppe um GERY Ergebnisse zu demselben Thema (17, 13). Als Techniken wendeten sie die Hämagglutination mit tannierten Erythrozyten, die Gelpräzipitation und die Komplementbindungsreaktion an und konnten damit herzspezifische Antikörper im Serum von Patienten mit verschiedenen Herzleiden zeigen. In jüngerer Zeit veröffentlichten HUCZEK-GLEBOCKI und Mitarb. (26) eine Studie über die quantitative Bestimmung von Serumantikörpern beim Myokardinfarkt, wobei sie die Methode der Immundiffusion in Agar mit einer Latextestmethode verglichen; letztere brachte eine geringfügig größere Anzahl von positiven Ergebnissen. Schließlich wurde 1973 auch von TAGG und Mc.GIVEN (47) die Anwesenheit von Herzmuskelfaser-Antikörpern in Sera von Patienten mit rheumatischem Fieber bestätigt.

Neben dem Nachweis von organspezifischen Antikörpern im Serum von Patienten besteht auch die Möglichkeit, Bestandteile der - infolge Krankheit - geschädigten Organzellen selbst, die ins Plasma übergetreten sind, nachzuweisen. Die heute allgemein übliche Enzymdiagnostik, des Herzinfarkts z.B., ist aufgrund von patho-physiologischen Vorgängen durchführbar, die mit einer Abgabe von Myokardfaserenzymen in die Blutbahn einhergehen. Der oftmals zweifelhafte Aussagewert der Enzymdiagnostik beim Myokardinfarkt ist hauptsächlich der Tatsache zuzuschreiben, daß die in Frage kommenden Enzyme nicht

nur im menschlichen Herzen, sondern auch in anderen Organen vorkommen und somit eine meßbare Veränderung dieser Enzymblutspiegel nicht herzspezifisch sein kann. Da nach einer Herzmuskelschädigung aber auch herzwebespezifische antigene Zellsubstanzen ins Plasma übertreten dürften, wäre es wünschenswert, eine Methode zum Nachweis dieser organspezifischen Antigene im Patientenserum zu erarbeiten. Hierzu bieten sich immunologische Techniken an, durch welche mit Hilfe eines geeigneten Antiserums die Anwesenheit spezifischer antigener Organbestandteile im Serum sichtbar gemacht werden kann.

Unter diesen Aspekten befaßte sich die vorliegende Arbeit mit der Darstellung einer Gruppe von menschlichen Herzmuskelproteinen. Sie wurden auf dem Wege der Immunelektrophorese mit Antiseren von Kaninchen, die gegen die genannte Myokardeiweißgruppe immunisiert worden waren, zur Reaktion gebracht. Zum Vergleich, d.h. zur Feststellung und zum Ausschluß von Kreuzreaktionen mit Antigenen anderer Organe, wurden sowohl eine Gruppe von menschlichen Skelettmuskelproteinen als auch von menschlichen Lebergewebeproteinen immunelektrophoretisch untersucht. Das Anliegen der Untersuchungen war die Erprobung einer immunologischen Methode zur Erkennung von myokardspezifischen Proteinen des Menschen, die z.B. im Serum von Patienten mit Myokardinfarkt vorhanden sein können.

II. MATERIAL UND METHODEN

In jüngster Zeit konnten organspezifische menschliche Herzantigene und Antikörper mit mehr oder weniger aufwendigen Methoden nachgewiesen werden, z.B. Geldiffusion, Immunfluoreszenz und Lymphozytentransformation (15, 16, 4). In der vorliegenden Arbeit sollte eine relativ unkomplizierte und zeitlich wenig aufwendige Methode zur Anwendung gebracht werden.

Mit Hilfe der Mikroelektrophorese, modifiziert nach der von SCHEIDEGGER (44) beschriebenen Technik, wurde eine Gruppe von menschlichen Herzmuskelproteinen mit Antiseren von Kaninchen, die gegen diese Myokardeiweißgruppe immunisiert worden waren, zur Präzipitation gebracht. Die hieraus ermittelten Präzipitationsmuster wurden mit denen verglichen, die sich aus der Immunelektrophorese derselben (gegen die Myokardproteine gerichteten) Kaninchenantisera mit definierten Anteilen aus menschlichem Skelettmuskelextrakt und menschlichem Leberextrakt ergaben.

A. Material

1. Der Herzmuskelextrakt

Der menschliche Herzmuskelextrakt und seine Fraktionen standen aus früheren Versuchen bereits zur Verfügung und waren in gleicher Weise wie später

der menschliche Skelettmuskel - und der menschliche Leberextrakt gewonnen worden (siehe dort).

Das Ausgangsmaterial stammte aus dem Herzen (M_1) einer jungen Person, die nach äußerer Gewalteinwirkung durch Verbluten ums Leben gekommen war. Es stand bereits wenige Stunden nach Eintritt des Todes in Trockeneis konserviert zur Verfügung. Vor dem Zerkleinern wurde das Herz aufgetaut, gewaschen und die Koronargefäße mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Das grob zerkleinerte Myokard wurde mit der doppelten Menge aqua dest. versetzt und bei 0°C homogenisiert. Anschließend wurde es unter ständigem Rühren 18 Stunden im Kühlschrank extrahiert. Der Gewebsbrei wurde zwei Stunden bei ca. 70.000 g und 0°C zentrifugiert und der Oberstand im Eiswasserbad durch Ultrafiltration konzentriert.

2. Die Antigenkomponenten des Herzmuskelextraktes

Die Darstellung der Antigenkomponenten erfolgte durch Auftrennung des Gesamtherzextraktes mittels der Zonelektrophorese auf Zelluloseazetatfolie nach KOHN (35). Hierbei zeigen sich 11 Komponenten, die nach NOWY (39), beginnend mit der der Anode am nächsten liegenden Bande, mit Komponente 1-11 bezeichnet werden (Abb. 1). Die Komponente 1 entspricht demnach dem am weitesten anodenwärts wandernden Myalbumin (37, 39) und die Komponente 6 dem etwa in der Mitte zwischen Anode und Kathode liegenden Myoglobin. Vergleicht man das Zonelektropherogramm des menschlichen Myokardextraktes mit

Darstellung der Zonenelektropherogramme des menschlichen Normalserums, des menschlichen Herzextraktes und der Komponenten E₈₋₁₁ des menschlichen Myokardextraktes

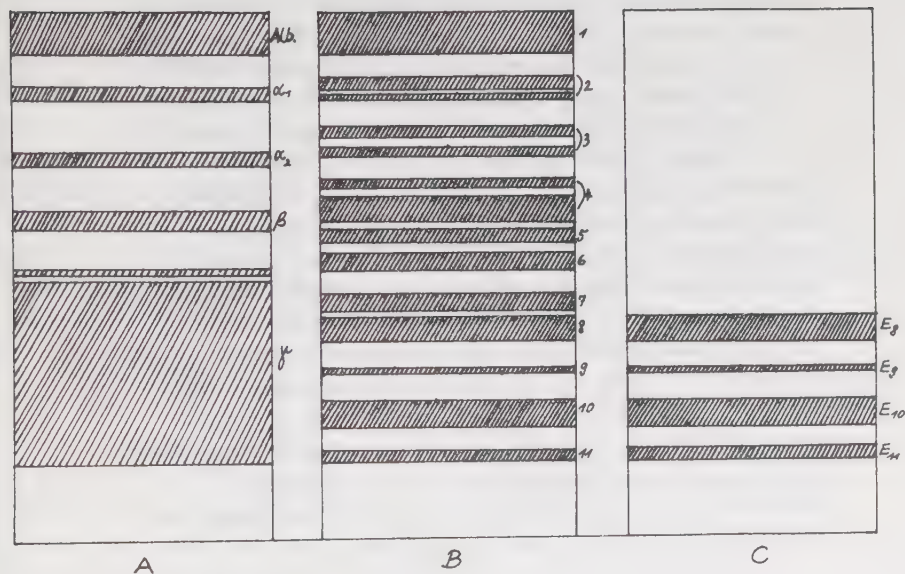


Abb. 1: Zonenelektrophorese

A - menschliches Normalserum

B - menschlicher Gesamt-Herzextrakt

C - die Komponenten E₈₋₁₁ des menschlichen Herzextraktes

dem Pherogramm eines menschlichen Normalserums, so liegt die Komponente 1 des Myokardextraktes (Myalbumin) auf gleicher Höhe wie die Albuminfraktion des Serums. Die Komponenten 7-11 des Myokardextraktes, die kathodenwärts vom Myoglobin (Komponente 6) liegen, haben die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie die γ -Globulinfraktion des Normalserums. Da sich diese 5 Komponenten (7-11) des Myokardextraktes, die etwa 30 % des gesamten Proteins ausmachen, durch die Kombination von kontinuierlicher präparativer Papierelektrophorese (siehe dort) und Gelchromatographie (NOWY 39) infolge ihres, gegenüber den Immunglobulinen relativ niedrigen Molekulargewichts von ca. 70.000, verhältnismäßig leicht von den Plasmaproteinen trennen ließen, wurden sie nach Lyophilisation zur Immunisierung der Kaninchen und für die immunelektrophoretischen Untersuchungen verwendet. Da bei der Isolierung die Komponente 7 nicht miterfaßt worden war, wurden die Versuche mit Komponente 8-11 durchgeführt. Die Gewinnung der einzelnen Komponenten war mit Hilfe der präparativen Papierelektrophorese erfolgt. Ihre endgültige Bezeichnung war: E₈, E₉, E₁₀ und E₁₁.

3. Der Skelettmuskelextrakt und der Leberextrakt

Ein Teil des Musculus Psoas und der Leber wurden der Leiche eines 51jährigen Mannes entnommen, die keinerlei Krankheitszeichen aufwies (Tod durch Suizid). Wenige Stunden nach der errechneten Todeszeit wurde die Obduktion vorgenommen. Die Organstücke wurden unmittelbar im Anschluß an die Entnahme in

flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Trockeneis konserviert. Die möglichst fett- und bindegewebsfreien Organstücke wurden zunächst gewogen und aufgetaut. Dann wurde das Material in Stücke von etwa $1-2 \text{ cm}^3$ Größe zerkleinert und dazu jeweils die doppelte Gewichtsmenge destilliertes Wasser zugesetzt. Das Organ-Wasser-Gemisch wurde im Homogenisator grob homogenisiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank mittels Rührer gleichmäßig fein homogenisiert. Danach wurde das Material 30 Minuten lang bei einer Rotorgeschwindigkeit von 30.000 bis 50.000 U/min in der Ultrazentrifuge behandelt. Der Überstand wurde zur Weiterverwendung abgegossen, der Rückstand wurde verworfen. Nach etwa zwölfstündiger Gefriertrocknung des Überstandes wurde die Trockensubstanz in verschließbare Fläschchen abgefüllt und im Gefrierfach des Kühlschranks bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

Unmittelbar vor Gebrauch des Materials wurde die Trockensubstanz in einer entsprechenden Menge aqua dest. aufgelöst (hier 1 gr in 10 ml), etwa 10 Minuten mit dem Magnetrührer gemischt und in einen Dialyseschlauch pipettiert. Die Dialyse erfolgte etwa 12 Stunden lang gegen Tutofusin-B-Lösung (Pfrimmer), unter ein- bis zweimaligem Wechsel des Tutofusins.

Wenn das aufgelöste Material längere Zeit im Kühlschrank gelagert werden mußte, wurde es vor Weiterverwendung nochmals 20 Minuten bei 4.000 U/min zentrifugiert. Nicht vollständig gelöste oder wieder ausgefallene Teilchen sollten dabei entfernt werden.

Die Bestimmung der Eiweißkonzentration der Substanzen, falls nicht bekannt, wurde mittels der BIURET-Methode durchgeführt. Bei zu niedriger Eiweißkonzentration (weniger als 6 gr %) konnte das Material mit Hilfe von Carbowax (Polyäthylenglykol) eingengt werden.

4. Die Antigenkomponenten des Skelettmuskel- und des Leberextraktes

Bei den immunoelektrophoretischen Untersuchungen wurde die oben beschriebene Gruppe der Herzmuskelproteine mit den elektrophoretisch entsprechenden Fraktionen des Skelettmuskel- und des Lebergewebeextraktes verglichen.

Bei Betrachtung des Zonenelektropherogrammes auf Zelluloseazetatfolie des menschlichen Skelettmuskelextraktes im Vergleich zu dem des Myokardextraktes (Abb. 2) finden sich im elektrophoretischen Bereich der Komponenten E_{7-11} des Herzmuskelextraktes 5 Banden. Diese wurden auf dem Wege der kontinuierlichen präparativen Papierelektrophorese isoliert und in drei Gruppen, den Komponenten S_a , S_b und S_c , gewonnen. In analoger Weise wurden die Antigenkomponenten des menschlichen Lebergewebeextraktes ausgewählt. Im Zonenelektropherogramm zeigen sich hier vier Banden, die in ihrer elektrophoretischen Mobilität mit den Komponenten E_{7-11} des Herzmuskelextraktes einerseits und mit den Komponenten S_{a-c} des Skelettmuskelextraktes andererseits verglichen werden können (Abb. 2). Mittels der präparativen Elek-

Darstellung der Zonenelektropherogramme der Komponenten E_{8-11} des menschlichen Myokardextraktes, S_{a-c} des Skelettmuskelextraktes und L_{a-c} des Lebergewebeextraktes.

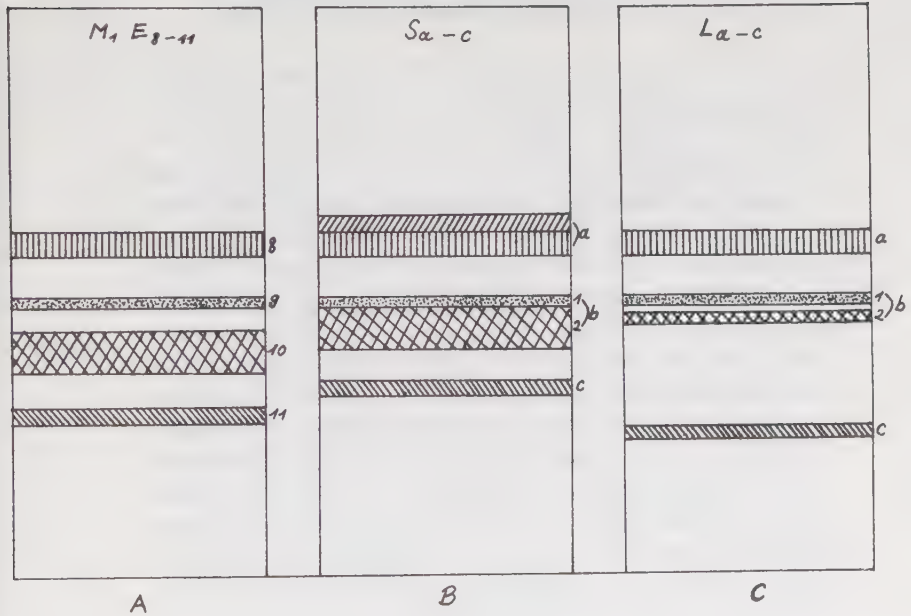


Abb. 2: Zonenelektrophorese

- A - Komponenten E_{8-11} des Myokardextraktes
- B - Komponenten S_{a-c} des Skelettmuskelextraktes
- C - Komponenten L_{a-c} des Lebergewebeextraktes

trophorese wurde dieser Proteinanteil des Leberextraktes in drei Gruppen, den Komponenten L_a , L_b und L_c , isoliert. Das Material wurde ebenso wie die Gesamtextrakte bis zur Weiterverwendung lyophilisiert und tiefgekühlt konserviert.

5. Die Antisera

Die Kaninchenantisera Anti- M_1 -K 193 und Anti- M_1 -K 196 standen aus früheren Versuchen bereits zur Verfügung.

Das zur Immunisierung verwendete Antigengemisch entstammte dem obengenannten Herzen (M_1) und umfaßte die beschriebenen Komponenten E_{8-11} . Die Immunisierung war nach dem von CLAUSEN (9) angegebenen langfristigen Verfahren durchgeführt worden. Die Kaninchen hatten fünfmal in Abständen von drei Wochen ca. 2,5 mg lyophilisiertes Protein mit Freund'schem Adjuvans und physiologischer Kochsalzlösung in den Fußballen injiziert bekommen. Eine Woche nach der letzten Injektion waren die Tiere ausgeblutet worden und die γ -Globuline durch präparative Elektrophoresen isoliert und lyophilisiert worden.

Bei der Immunpräzipitation gegen menschliches Normalserum stellte sich heraus, daß beide Antiseren Spuren von Anti-IgG enthielten. Um diesen "Störfaktor" für die Pherogramme auszuschalten, entfernte ich das Anti-IgG durch Absorption mit reinem menschlichen IgG (Fa. Behring) und anschließendem Abzentrifugieren. Zur Kontrolle, daß die Kaninchen-Seren frei von Anti-IgG waren, diente die bidimensionale Immundiffusion nach OUCHTERLONY (41)

B. Methoden

1. Die Immunelektrophorese (Abb. 3)

(Elektrophorese, modifiziert nach dem Mikroverfahren,
beschrieben von SCHEIDEGGER (44).)

Cellogel-Streifen (Fa. Chemetron, Mailand), 2,5 x 14 cm, werden bis zur Verwendung in 50%igem wässrigem Methanol aufbewahrt. Vor dem Gebrauch werden die Folien mindestens eine halbe Stunde lang in Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, PH 8,9 (ARRONSON und GRÜNWALL (1)) eingeweicht, aber nicht länger als 12 Stunden. Die zwischen Filterpapier getrockneten Streifen werden mit der matten Seite nach oben auf die Elektrophoresebrücke (Fa. Beckmann, München) gebracht. Die dazu notwendigen Objektträger-Unterlagen (76 x 26 mm) waren vorher auf der Brücke unverschiebbar aufgeklebt worden. Nach blasenfreier Lagerung des Cellogel-Streifens auf dem fettfreien Objektträger erfolgt das Aufsetzen der Auftragschablone (Fa. Beckmann, München). Dabei schadet es nicht, wenn die überhängenden Enden der Streifen etwas abgeknickt werden. Die Kennzeichnung der Streifen erfolgt am besten durch Anbringen von Kerben mit der Schere an einer Schmalseite der Folie. An diesem gekerbten Ende des Streifens sollte der Übersicht halber auch die Auftragsstelle des Serums lokalisiert sein. Das "Serum" (hier die Gewebsextrakte) wird mit einem Mikrostempel (Sample-Applicator, Fa. Beckmann, München) und mit Hilfe der Schablone auf den Cellogelstreifen aufgetragen. Diese können so mit einer standardisierten Menge des Materials (0,25 μ l) beschickt

Die modifizierte Mikro-Immunelektrophorese

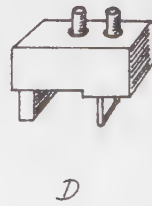
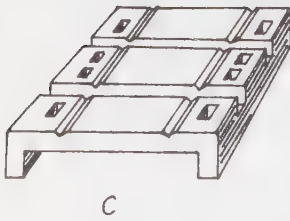
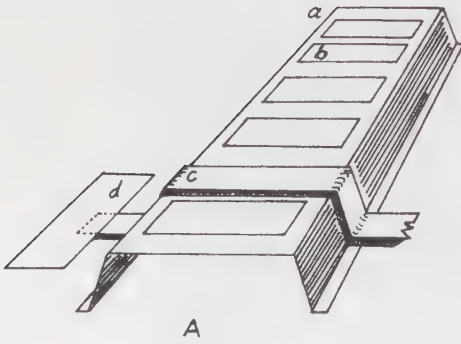


Abb. 3: Immunelektrophorese

- A. a. Elektrophoresebrücke
b. Objektträger
c. Cellogelstreifen
d. Puffergetränktes Filterpapier
- B. a. Cellogelstreifen
b. Auftragsstelle des Extraktes
c. Auftragslinie des Antiserums
d. Einkerbungen zur Kennzeichnung
- C. Auftragsschablone
- D. Auftragsstempel
- E. Arbeitsgang
 - a) Den puffergetränkten Cellogelstreifen (B) auf die Brücke (A) legen.
 - b) Ein Ende des Cellogelstreifens mit feuchtem Filterpapier (A. d.) bedecken
 - c) Die Schablone (C.) auf die Brücke setzen, so daß eine Rille über der Mitte eines Cellogelstreifens liegt
 - d) Den Auftragsstempel auf die Schablone setzen und Organextrakt auftragen
 - e) Nach Auftrennung in der Elphorkammer gleiche Versuchsanordnung herstellen und den mit Antiserum getränkten Faden in der Rille der Schablone fixieren. Diesen Versuchsaufbau anschließend in die feuchte Kammer bringen.
- F. Die wichtigsten Daten:
 - Elektrophoresekammer: Fa. Bender & Hobein, München
 - Folie: Cellogelfolie (Fa. Chemetron, Mailand)
 - Trennstrecken: 10 cm
 - Elektrophorese: 4 Stunden bei 200 Volt
 - Puffer: Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, pH 8,9

werden. Bei einer Eiweißkonzentration der Gewebsextrakte, eingestellt auf rund 6 g %, wie sie im menschlichen Normalserum zu finden ist, wird der Stempel 2 x 15 sec lang aufgesetzt. Während dieses Arbeitsganges können die Cellogelstreifen sehr leicht austrocknen. Deshalb bedeckt man die den Auftragsstellen der Gewebsextrakte entgegengesetzt liegenden Enden der Streifen mit einem puffergetränkten (Tris-EDTA-Borsäure-Puffer) Filterpapier, damit der Puffer durch den Gelstreifen angesaugt werden kann und dieser gleichmäßig feucht bleibt.

Nach dem Auftragen der Extrakte werden die Schablonen abgenommen, die Streifen vorsichtig an beiden Enden mit einer anatomischen Pinzette angefaßt und in der Elektrophoresekammer (Fa. Bender & Hobein, München) frei aufgespannt. Die Auftragspunkte der Extrakte sind zur Kathode gerichtet und sollen sich nicht weniger als 15 mm von der Auflagefläche entfernt befinden (Abb. 3).

Die Elektrophorese erfolgt über 4 Stunden bei 200 Volt. Die Trennstrecke beträgt 10 cm.

Nach Entnahme der Streifen aus der Elektrophoresekammer werden sie mit Hilfe der Schablonen wieder blasenfrei auf den Objektträgern fixiert und mit befeuchtetem Filterpapier wieder vor Austrocknung geschützt. Das Auftragen der Antisera wird wie folgt durchgeführt:

Das Antiserum wird mit einer 100 μ l-Pipette bis zur 100 μ l-Marke aufgezogen und dann ganz langsam gegen

das obere Ende eines senkrecht aufgehängten Baumwollstopfgarnfadens geblasen, der sich auf diese Weise maximal mit dem Antiserum vollsaugt. Der Faden ist doppelt genommen, besteht also aus 8 Einzelfäden und ist 10 cm lang. Er soll nicht in sich gedreht sein, sondern die Einzelfäden parallel und dicht nebeneinander gelagert sein, damit eine möglichst gleichmäßige Antiserumabgabe gewährleistet ist. Der mit Antiserum getränkte Faden wird in die Längsrille der Schablone gelegt, straffgezogen und mit der Längsseite einer 1-2 mm dicken Glasplatte leicht und gleichmäßig an die Cellogelfolie gedrückt (Abb. 3).

Dieser Versuchsaufbau wird nun in unveränderter Anordnung in die feuchte Kammer gebracht. Es muß darauf geachtet werden, daß die Streifenenden und die Fäden nicht mit Boden oder Wänden der Kammer in Kontakt kommen, da andernfalls die Diffusion des Antiserums irreversibel gestört werden kann.

Nach einer Diffusionszeit von optimal 60 Stunden bei Raumtemperatur werden die Streifen wieder der feuchten Kammer entnommen.

Das Auswaschen der Streifen geschieht mit Hilfe des Magnetrührers: Die Streifen werden einzeln nebeneinander in ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefülltes Becherglas (250 ml) gehängt. Dabei werden die nicht eingekerbten Enden der Streifen um den Rand des Becherglases gebogen und durch eine darübergelegte Glasplatte fixiert. Der Magnetskern soll eine niedrige bis mittlere Drehgeschwindigkeit haben, so daß die Streifen nur leicht flattern. Die Dauer des Wasch-

vorganges beträgt mindestens 45 Minuten und möglichst nicht viel mehr als eine Stunde. Ein Wechsel des NaCl-Bades ist dabei nicht notwendig.

Nach dem Waschen werden die Folien in folgender Reihenfolge behandelt:

Färben der Folien: 5 Min. in Amidoschwarz

Zusammensetzung der Farblösung:

0,5 g Amidoschwarz 10 B

50 ml Methanol

10 ml Eisessig

50 ml aqua dest.

Entfärben der Folien:

Die Folien werden mindestens 10 Minuten lang in Elphorentfärber gelegt bzw. solange, bis die Folien - außer im Bereich der Präzipitationslinien und der Extraktauftragstellen - keine Farbreste mehr aufweisen.

Zusammensetzung des Entfärbers:

9 Teile Methanol

1 Teil Eisessig.

Transparenzbad:

Die Folien werden nebeneinander - nicht übereinander, da sie sonst miteinander verkleben können - in die Transparenzflüssigkeit gelegt und verbleiben darin 8-12 Minuten.

Zusammensetzung der Transparenzlösung:

7 Teile Methanol

3 Teile Eisessig.

Aufkleben der Folien auf Objektträger:

Nach dem Transparenzbad sind die Folien sehr weich und müssen vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette aufgenommen und falten- und luftblasenfrei über einen sauberen Objektträger gespannt werden. Überstehende Enden werden bis auf eine Länge von etwa 5 mm abgeschnitten und nach unten umgeschlagen. Man achte darauf, daß man die Objektträger auf eine zuvor beschriftete Unterlage legt, da die zur Kennzeichnung angebrachten Kerben nach dem Trocknen der Folien entweder schlecht zu sehen sind oder bereits abgeschnitten wurden.

Trocknen der aufgeklebten Folien:

Nach mehreren Stunden Lagerung, am besten über Nacht, sind die Folien trocken und hart und mit dem Objektträger fest verhaftet. Jetzt können sie mit einem Tuscheschreiber beschriftet werden.

2. Weitere verwendete Methoden

a) Die Zonenelektrophorese auf Zelluloseazetatfolie nach KOHN (35)

Diese Methode diente durch Auftrennung der Organextrakte und Extraktfraktionen zur Darstellung der einzelnen Antigenkomponenten. Hierbei wurde die Zonenelektrophorese mit frei aufgespannter Folie bei 200 Volt über 8 Stunden durchgeführt (Abb. 4).

Die Extrakte wurden mit Kunststoffpipetten entlang

Schematische Darstellung der Zonenelektrophorese
auf Zelluloseazetatfolie

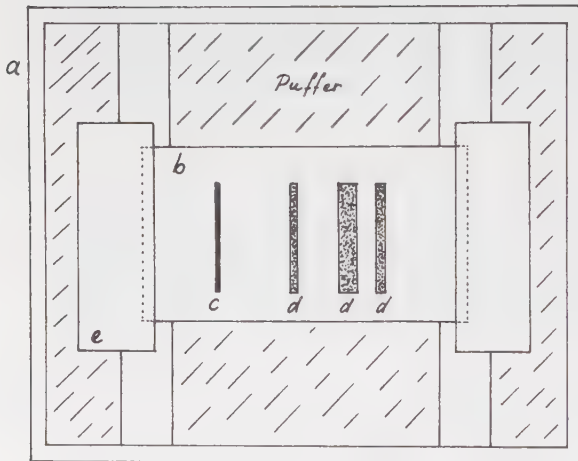


Abb. 4: Zonenelektrophorese

- A. a) Elektrophoresekammer
b) Zelluloseazetatfolie
c) Auftraglinie des Extraktes
d) Proteinbanden nach Auftrennung
e) Filterpapierdocht

B. Die wichtigsten Daten:

Elektrophoresekammer: Fa. Bender & Hobein, München

Membranfolien: Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen

Trennstrecke: 17 cm

Elektrophorese: 8 Stunden ~ 200 Volt

Puffer: Tris-EDTA-Borsäure-Puffer-pH 8,9

einem runden Glasstab (als Lineal) in gedämpfter Schwingung aufgetragen. Die Folie wurde dabei zwischen zwei Glasplatten aufgespannt. Nach der Auftrennung der Extrakte wurden die Folien sofort mit Amidoschwarz gefärbt und nach dem Entfärbebad kurz zwischen glattem Filterpapier abgetrocknet. Anschließend wurden sie auf einer Glasplatte blasenfrei glattgestrichen, um beim Trocknen eine Faltenbildung zu vermeiden. Da sich die Folien während des Trocknungsvorganges anspannen und leicht einreißen, mußten sie in halbtrockenem Zustand nochmals von der Glasplatte abgelöst und locker um die Ränder der Platte geknickt werden. Die vollständige Trocknung der Folien erfolgte über Nacht.

Die wichtigsten Daten:

Elektrophoresekammer: Firma Bender & Hobein, München

Membranfolien: Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen

Trennstrecke: 17 cm

Elektrophorese: 8 Stunden bei 200 Volt

Puffer: Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, pH 8,9

b) Die kontinuierliche präparative Papierelektrophorese

Mit Hilfe dieser Methode wurden durch Auftrennung der Organextrakte und ihrer Fraktionen die einzelnen Antigenkomponenten bzw. Komponentengruppen in Lösung gewonnen (Abb. 5). Die Elektrophorese wurde an dem Gerät Elphor Va (Fa. Bender & Hobein, München), das von GRASSMANN und HANNIG (21) entworfen

Schematische Darstellung der kontinuierlichen präparativen Papierelektrophorese

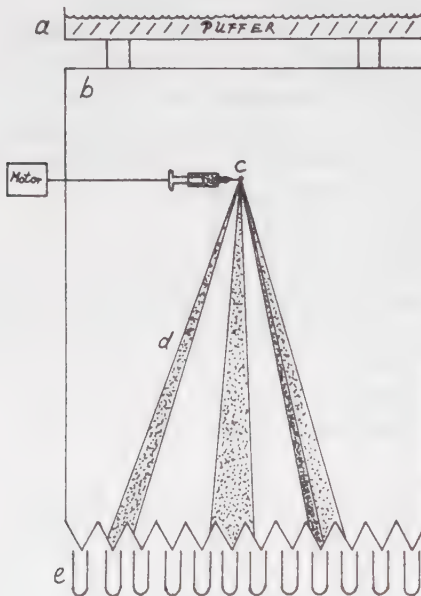


Abb. 5: Papierelektrophorese

- A. a) Pufferbehälter
b) Papierfolie
c) Auftragspunkt des Extrakts
d) Proteinbahnen nach Auftrennung
e) Reagentgläser
- B. Die wichtigsten Daten:
Apparatur: Elphor Va (Bender & Hobein, München)
Papier: Schleicher & Schüll 2043 bmgI und 2040a
Trennstrecke: 45 cm
Elektrophorese bei 400 Volt
Puffer: Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, pH 8,9
mit 2,5 Teilen Wasser verdünnt

wurde und mit einem Kühlsystem ausgestattet ist, durchgeführt. Dabei wurde das Eiweißgemisch mittels einer Motorspritze gleichmäßig und punktförmig auf ein vertikal aufgespanntes Filterpapier aufgetragen. Im senkrechten Pufferstrom wanderte das Material von oben nach unten. In einem horizontal angelegten elektrischen Feld (hier: 400 Volt) wurden die Proteinfractionen entsprechend ihren elektrischen Ladungen verschieden stark in horizontaler Richtung abgelenkt. Am unteren gezackten Rand des Papiers tropften die Komponenten getrennt in Reagensgläser. Nach Einengung mit Carbowax konnten sie weiterverwendet werden.

Die wichtigsten Daten:

Apparatur: Elphor Va (Fa. Bender & Hobein, München)

Papier: Schleicher und Schüll 2043 bmg1 und 2040a

Elektrophorese bei 400 Volt

Trennstrecke: 45 cm

Puffer: Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, pH 8,9

mit 2,5 Teilen Wasser verdünnt.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND IHRE ERGEBNISSE

A. Die Immunelektrophorese mit einer Proteingruppe des menschlichen Herzmuskelextraktes und Antiherz-Antiserum vom Kaninchen

Als Antigen wurden die Komponenten E_8 , E_9 , E_{10} und E_{11} des menschlichen Herzmuskelextraktes M_1 sowohl als Gemisch als auch einzeln verwendet (Abb. 1).

Als Antiseren wurden die Seren der Kaninchen 193 und 196 (Anti- M_1 -K 193 und Anti- M_1 -K 196) verwendet, die mit dem Antigengemisch E_{8-11} aus dem menschlichen Myokardextrakt M_1 immunisiert worden waren.

Das Präzipitationslinienbild der Herzmuskelproteine mit beiden Kaninchen-Antisera war jeweils identisch.

Ergebnis der Immunelektrophorese (Abb. 6):

- a) Antigen: Komponente M_1-E_8
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Es zeigte sich eine ganz zarte Präzipitationslinie mit geringem, aber deutlichem Abstand von der Antiserumauflagelinie.
- b) Antigen: Komponente M_1-E_8 und E_9
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Hier ergab sich in gleicher Höhe wie

bei a) eine scharf gezeichnete, aber längere Präzipitationsbande.

- c) Antigen: Komponente M_1-E_9
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Hier ergab sich das gleiche Bild wie bei b)
- d) Antigen: Komponente M_1-E_9 und E_{10}
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Es zeigten sich zwei Präzipitationslinien nebeneinander, also in gleicher Höhe und zwar etwas näher zur Kathode liegend als a) bis c). Eine Linie, nahe an der Antiserumauftraglinie liegend, ist scharf gezeichnet und schwach gebogen. Die zweite liegt deutlich getrennt lateral von der ersten, ist ebenfalls scharf gezeichnet, aber kürzer und stärker gekrümmt.
- e) Antigen: Komponente M_1-E_{10}
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Hier zeigte sich das gleiche Bild wie bei d). Allerdings scheint die medial gelegene Linie hier schwächer ausgebildet zu sein als bei d).
- f) Antigen: Komponente M_1-E_{11}
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Die etwas verwaschen gezeichnete einzige Linie liegt wiederum etwas näher der Kathode als d) und e) und zieht sich eng an der Antiserumauftraglinie entlang.

Darstellung der Immunelektrophorese der Komponenten E_{8-11} des menschlichen Myokardextraktes M_1

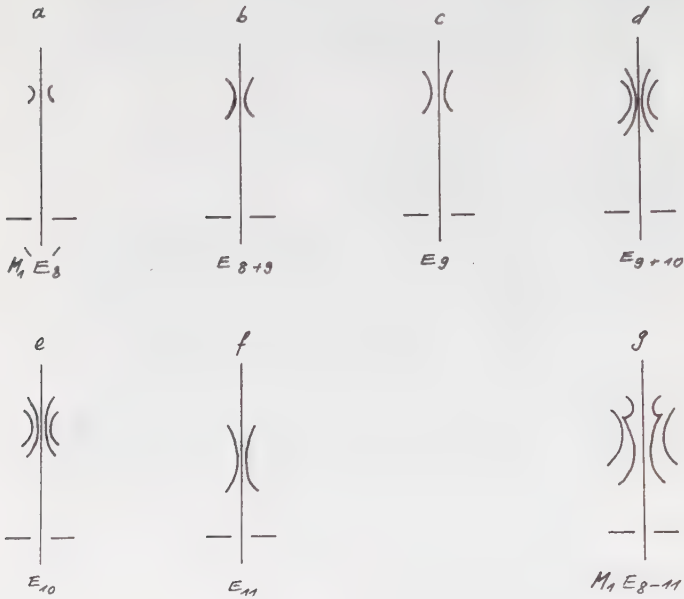


Abb. 6: Immunelektrophorese

- a) Komponente E_8
 b) Komponenten E_{8+9}
 c) Komponente E_9
 d) Komponenten E_{9+10}
 e) Komponente E_{10}
 f) Komponente E_{11}
- mit Kaninchen-Antiserum:
 Anti- M_1 -K 193
- g) Antigengemisch der Komponenten E_{8-11}
- mit Kaninchen-Antiserum:
 Anti- M_1 -K 193 und Anti- M_1 -K 196

- g) Antigen: Antigengemisch M_1-E_{8-11}
Antiserum: Anti- M_1 -K 196 bzw. Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Am nächsten der Antiserumauftraglinie und ebenso am nächsten der Kathode liegt eine deutlich gezeichnete, weich gebogene Präzipitationslinie, die an ihrem anodischen Ende in eine schwach sichtbare, kurze, flach geschwungene Linie übergeht.
Klar abgehoben von der ersten Linie, auf gleicher Höhe lateral davon, liegt eine ebenso deutliche, aber stärker gekrümmte und kürzere Linie.
Im Immunelektropherogramm des Herzmuskel-Antigengemisches M_1-E_{8-11} ließen sich nicht wie erwartet die Linien jeder einzelnen Komponente getrennt wiederfinden. Offensichtlich laufen hier einige Präzipitationsbanden zu einer einzigen zusammen. Und zwar die medial gelegene von E_{10} (bzw. $E_{9/10}$) und die von E_{11} .

B. Die Zonenelektrophorese und Immunelektrophorese mit einer Proteingruppe des menschlichen Skelettmuskelextraktes

Untersucht wurde die Proteingruppe des menschlichen Skelettmuskels Musculus Psoas "S" und ihre einzelnen Komponenten, die in der Zonenelektrophorese im gleichen Mobilitätsbereich liegen wie die Proteingruppe

M₁E₈₋₁₁ des menschlichen Herzmuskelextraktes (Abb. 1 und 2). Mittels der präparativen Papierelektrophorese des Psoasextraktes "S" wurden die kathodisch vom Myoglobin gelegenen Komponenten gesammelt, in drei Portionen aufgeteilt, eingeengt und mit S_a, S_b und S_c benannt. In der Zonenelektrophorese bildete dementsprechend S_a den schnellsten Anteil der gesammelten Komponenten, S_b den mittleren und S_c den langsamsten Anteil.

1. Ergebnis der Zonenelektrophorese (Abb. 2)

Im Vergleich mit dem Elektropherogramm des Myokardextraktes M₁ ergab sich eine gewisse Entsprechung der Komponenten M₁E₈₋₁₁ mit den Komponenten S_{a-c} vom Psoasextrakt. Dabei lag S_a gegenüber, d.h. auf gleicher Höhe mit der Bande E₈, S_b gegenüber E₈₋₁₁ und S_c gegenüber E₁₁. Die Bande S_a besteht aus einer Doppellinie, deren langsamer Anteil die gleiche Mobilität aufweist wie die Bande von E₈ des Myokardextraktes. Der schnellere Anteil von S_a (S_{a1}) liegt anodenwärts von S_{a2} bzw. von E₈. In der Zone von S_b des Skelettmuskelextraktes, die den Banden E₉ und E₁₀ des Myokardextraktes entspricht, sind ebenso zwei nicht deutlich voneinander getrennte Linien erkennbar (S_{b1} und S_{b2}). Dieser Bereich stellt eine Einheit mit der elektrophoretischen Beweglichkeit von E₉ dar. Die Mobilität von S_c liegt zwischen der von E₁₀ und E₁₁.

2. Ergebnisse der Immunelektrophorese (Abb. 7)

Die Immunelektrophorese der Antigenkomponenten S_{a-c} des Skelettmuskelextraktes wurde mit den Antiseren der Kaninchen 193 und 196 (Anti- M_1 -K 196 und Anti- M_1 -K 193) durchgeführt.

- a) Antigen: Komponente S_a
Antiserum: Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Eine zarte kurze Präzipitationslinie.
- b) Antigen: Komponente S_b
Antiserum: Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Zwei Präzipitationslinien näher zur Kathode liegend als bei a); eine etwas verwaschene, langgezogene laterale und auf gleicher Höhe eine mediale, schärfer gezeichnete und stärker als erstere gekrümmte Linie.
- c) Antigen: Komponente S_c
Antiserum: Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Eine deutliche, scharf konturierte Präzipitationslinie, die zur Kathode hin doppelt geschweift ist.
- d) Antigen: Antigengemisch aus S_a , S_b und S_c
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Am nächsten der Kathode liegt, abgesetzt von der Antiserumauftraglinie, eine zarte, weichbogige Linie, die mit ihrem anodischen Ende mit der Konvexität einer doppelt konturierten

Darstellung der Immunelektropherogramme der
Komponenten S_{a-c} des menschlichen Skelettmuskelextraktes

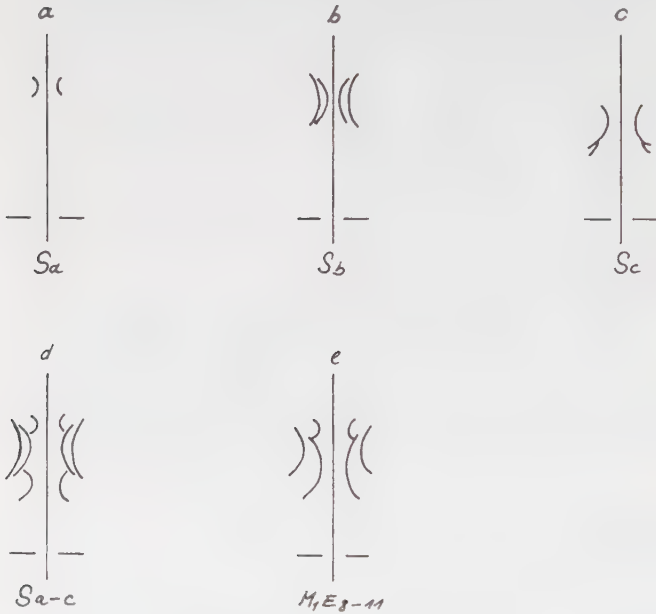


Abb. 7: Immunelektrophorese

- a) Komponente S_a
 - b) Komponente S_b
 - c) Komponente S_c
 - d) Antigengemisch der Komponenten S_{a-c}
 - e) Zum Vergleich das Immunelektropherogramm der Komponenten E_{8-11} des Myokardextraktes M_1
- mit Kaninchenantiserum:
 Anti- M_1 -K 193
 mit Kaninchenantiserum:
 Anti- M_1 -K 196

stärker gekrümmten Linie verschmilzt. In gleicher Höhe findet sich ganz nahe an der Antiserumauftraglinie eine kurze, nur schwach sichtbare Präzipitationslinie.

In diesem Pherogramm des Skelettmuskel-Antigengemisches S_{a-c} finden sich die einzelnen Präzipitationsbanden der Komponenten S_a , S_b und S_c wieder. Allerdings läßt sich die Doppelschweifigkeit der der Komponente S_c entsprechenden Linie auf dem Gesamtpherogramm nicht erkennen.

C. Die Zonenelektrophorese und Immunelektrophorese mit einer Proteingruppe des menschlichen Lebergewebeextraktes

Untersucht wurde die Proteingruppe des menschlichen Lebergewebeextraktes "L" und ihre einzelnen Komponenten, die in der Zonenelektrophorese im gleichen Mobilitätsbereich liegen wie die Proteingruppe $M_{1-E8-11}$ des menschlichen Herzmuskelextraktes einerseits, sowie der Proteingruppe S_{a-c} des menschlichen Skelettmuskelextraktes andererseits. (Abb. 1 und 2). Entsprechend dem Verfahren beim Skelettmuskelextrakt wurden mittels der präparativen Papierelektrophorese drei Komponentengruppen gesammelt, eingengt und mit L_a , L_b und L_c bezeichnet. In der Zonenelektrophorese bildet dementsprechend L_a den schnellsten Anteil der gesammelten Komponenten, L_b den mittleren und L_c den langsamsten.

1. Ergebnis der Zonenelektrophorese (Abb. 2)

Im Vergleich zu dem Elektropherogramm des Myokardextraktes M_1 liegt L_a gegenüber, d.h. auf gleicher Höhe von E_8 , L_b liegt gegenüber von E_9 und E_{10} , wobei eine schwächere Bande die elektrophoretische Beweglichkeit von E_9 aufweist (L_{b1}) und eine deutlichere, d.h. stärker angefärbte, scharf begrenzte Bande entsprechend einer Zone zwischen E_9 und E_{10} liegt (L_{b2}) - und L_c liegt gegenüber E_{11} , mit allerdings geringerer elektrophoretischer Mobilität und schwächerer Zeichnung als diese.

2. Ergebnis der Immunelektrophorese (Abb. 8)

Die Immunelektrophorese der Antigenkomponenten L_{a-c} des Lebergewebeextraktes wurden mit den Antiseren der Kaninchen 193 und 196 (Anit- M_1 -K 193 und Anti- M_1 -K 196) durchgeführt.

a) Antigen: Komponente L_a
Antiserum: Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Am weitesten anodisch liegend zeigt sich deutlich abgesetzt von der Antiserumauftraglinie eine ganz zarte, kurze Präzipitationslinie.

Antigen: Komponente L_b
Antiserum: Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Eine längere, etwas verwaschene, aber deutliche, weich gebogene Linie, näher der Kathode liegend als bei a).

Darstellung der Immunelektropherogramme der
Komponenten L_{a-c} des menschlichen Lebergewebeextraktes

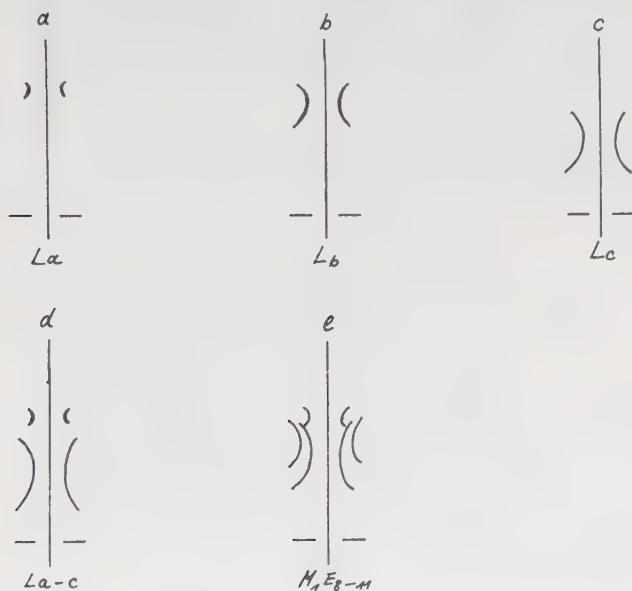


Abb. 8: Immunelektrophorese

- a) Komponente L_a
 - b) Komponente L_b
 - c) Komponente L_c
 - d) Antigengemisch der Komponenten L_{a-c}
 - e) Zum Vergleich das Immunelektropherogramm der Komponenten E_{8-11} des Myokardextraktes M_1
- mit Kaninchenantiserum:
Anti- M_1 -K 193
- mit Kaninchenantiserum:
Anti- M_1 -K 196

- c) Antigen: Komponente L_c
Antiserum: Anti- M_1 -K 193
Ergebnis: Eine schwach gezeichnete, ebenso lange (wie bei b) und ebenfalls weichbogige Präzipitationslinie, die von allen drei Linien am nächsten der Kathode liegt.
- d) Antigen: Antigengemisch aus L_a , L_b und L_c
Antiserum: Anti- M_1 -K 196
Ergebnis: Es ergaben sich zwei Präzipitationslinien: eine deutlich abgesetzt von der Antiserumauflauflinie, klar gezeichnet und eine zweite weiter anodwärts und medial liegend als erstere, etwas kürzer, flacher gekrümmt und weniger deutlich sichtbar. Offenbar sind im Immunelektrophogramm des Leber-Antigengemisches L_{a-c} die Linien von L_b und L_c miteinander verschmolzen.

D. Vergleich der Elektrophogramme der drei Organextrakte

1. Vergleich der Komponenten E_8 , S_a und L_a in der Zonenelektrophorese (Abb. 2)

Hiernach weist die Bande E_8 des Myokardextraktes die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit auf wie der langsamere Anteil einer Doppelbande S_a des

Skelettmuskelextraktes (S_{a2}). Dem elektrophoretisch schnellsten Anteil dieser Doppelbande S_a (S_{a1}) entspricht hinsichtlich seiner elektrophoretischen Beweglichkeit keine Linie im Pherogramm des Myokardextraktes und keine Linie im Pherogramm des Leberextraktes. Die elektrophoretisch schnellste Komponente des Leberextraktes liegt auf gleicher Höhe wie die Bande E_8 des Myokardextraktes und ebenso wie der langsamere Anteil der Doppelbande S_a des Skelettmuskelextraktes (S_{a2}).

2. Vergleich der Komponenten E_8 , S_a , L_a in der Immunelektrophorese (Abb. 9)

Die Komponente E_8 bildet mit dem Antiserum im Immunelektropherogramm eine zarte, kurze Präzipitationslinie, die in Form, Größe und Lage der Präzipitationslinie, die die Komponente S_a mit dem Antiserum bildet, völlig gleicht. Ebenso hat die Präzipitationslinie, die die Komponente L_a mit dem Antiserum bildet, die gleiche Form und Lage wie die obengenannten. Sie liegt am nächsten der Anode. Dies entspricht dem Ergebnis der Zonelektrophorese, wo sich die Komponenten E_8 , S_{a2} (langsamer Anteil) und L_a in ihren elektrophoretischen Eigenschaften gleichen. Die beiden Komponenten S_{a1} und S_{a2} des Skelettmuskelextraktes bilden mit dem Antiserum eine einheitliche Präzipitationslinie.

3. Vergleich der Komponenten E_9/E_{10} , S_b und L_b
in der Zonenelektrophorese (Abb. 2)

Im Zonenelektropherogramm des Myokardextraktes M_1 liegt kathodenwärts von der Bande der Komponente E_8 die Bande der Komponente E_9 . Auf der Höhe von E_9 liegt im Pherogramm des Skelettmuskelextraktes S eine Doppelbande, die Komponente S_b , deren schnellerer Anteil (S_{b1}) die gleiche elektrophoretische Mobilität aufweist wie E_9 , deren langsamem Anteil aber keine Linie im Pherogramm des Myokardextraktes gegenüberliegt. Dagegen findet sich im Pherogramm des Leberextraktes eine Linie, die den elektrophoretisch schnelleren Anteil der Komponente L_b des Leberextraktes (L_{b1}) darstellt, und die die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie E_9 und wie die Komponente S_{b1} aufweist. Sehr nahe an dieser Linie, dennoch isoliert davon, liegt kathodenwärts die Bande des langsameren Anteils von L_b (L_{b2}). Sie hat elektrophoretisch eine etwas größere Beweglichkeit als der langsamere Anteil von S_b (S_{b2}); im Pherogramm des Sekelettmuskelextraktes liegt ihr gegenüber demnach keine Linie, ebenso wenig im Pherogramm des Myokardextraktes.

Der Bande E_{10} , die kathodenwärts und getrennt von der Bande E_9 des Myokardextraktes liegt, findet sich in den Pherogrammen des Skelettmuskelextraktes und des Leberextraktes keine Linie mit gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit gegenüber.

Vergleich der Immunelektrophorene der Komponenten E₉₋₁₁ des menschlichen Myokardextraktes, S_{a-c} des Skelettmuskel-extraktes und L_{a-c} des Lebergewebeextraktes

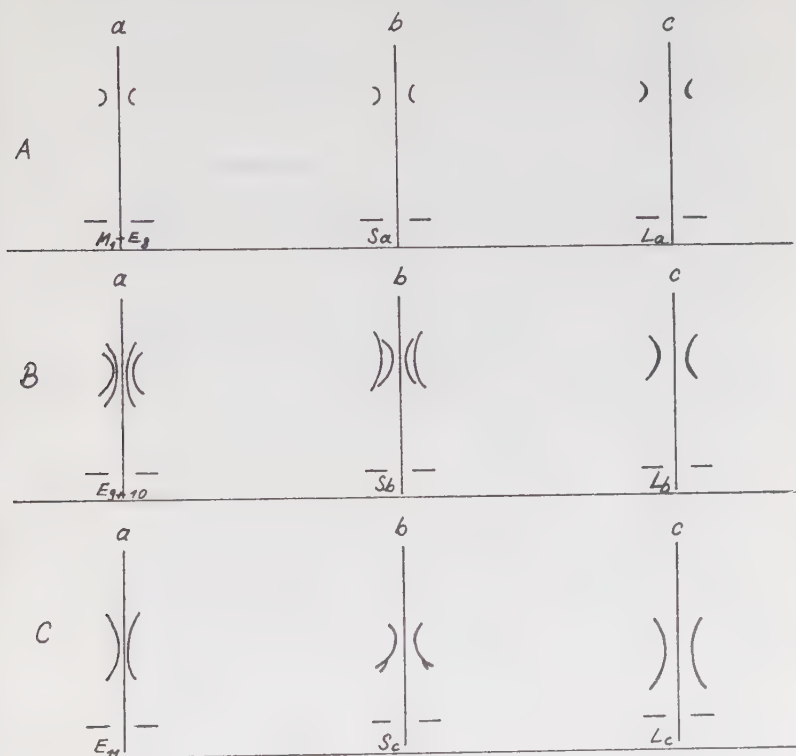


Abb. 9: Immunelektrophorese

- A. a) Komponente E₈ des Myokardextraktes
- b) Komponente S_a des Skelettmuskelextraktes
- c) Komponente L_a des Lebergewebeextraktes
- B. a) Komponenten E₉₊₁₀ des Myokardextraktes
- b) Komponente S_b des Skelettmuskelextraktes
- c) Komponente L_b des Lebergewebeextraktes
- C. a) Komponente E₁₁ des Myokardextraktes
- b) Komponente S_c des Skelettmuskelextraktes
- c) Komponente L_c des Lebergewebeextraktes

— mit Kaninchenantiseren: Anti-M₁-K 193

und Anti-M₁-K 196

4. Vergleich der Komponenten E_9/E_{10} , S_b und L_b
in der Immunelektrophorese (Abb. 9)

Im Immunelektropherogramm der Komponenten E_9/E_{10} des Myokardextraktes finden sich zwei Präzipitationslinien. Die Linie, die weiter von der Antiserumauftraglinie entfernt liegt, ist mit der Präzipitationslinie identisch, die immunelektrophoretisch durch die Komponente E_9 allein zustande kommt. Die Komponente E_{10} scheint bei der präparativen Elektrophorese ungenügend von der Komponente E_9 getrennt worden zu sein, da sich bei der Immunelektrophorese von E_{10} einerseits und E_9/E_{10} andererseits dasselbe Präzipitationsmuster ergibt. Dabei ist E_{10} der Linie zuzuordnen, die näher an der Antiserumauftraglinie liegt.

Im Immunelektropherogramm der Komponente S_b des Skelettmuskelextraktes finden sich zwei Präzipitationslinien, ebenso wie im Immunelektropherogramm der Komponenten E_{9+10} des Myokardextraktes. Nach dem Zonenelektropherogramm haben die Komponenten E_9 und S_{b1} zwar dieselbe elektrophoretische Mobilität, nicht dagegen die Komponenten E_{10} und S_{b2} . Nach dem Ergebnis der Immunelektrophorese sind aber die Antigenkomponenten E_9 und E_{10} des Herzmuskelextraktes mit den Antigenkomponenten S_{b1} und S_{b2} identisch, da die gegen die Myokardproteine gerichteten Kaninchenantisera mit beiden Organproteingruppen jeweils zwei Präzipitationslinien bilden.

Im Elektropherogramm der Komponente L_b des Leberextraktes findet sich eine Präzipitationslinie. Ent-

sprechend dem Zonenelektropherogramm ist sie der Komponente L_{b1} zuzuordnen, und somit mit den Komponenten E_g und S_{b1} , die zonenelektrophoretisch dieselbe Schnelligkeit wie L_{b1} aufweisen, identisch.

Mit der Komponente L_{b2} des Leberextraktes bilden die gegen die Myokardproteine gerichteten Kaninchenantiseren entweder keine Präzipitate, oder L_{b1} und L_{b2} stellen eine antigene Einheit dar.

5. Vergleich der Komponenten E_{11} , S_c und L_c in der Zonenelektrophorese

In dem Zonenelektropherogramm des Myokardextraktes findet sich am nächsten der Kathode die Bande der Fraktion E_{11} , die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit keiner der Banden aus den Phorogrammen des Skelettmuskelextraktes und des Leberextraktes zu vergleichen ist. Die Komponente S_c des Skelettmuskelextraktes weist eine größere Mobilität als E_{11} auf, die Komponente L_c des Leberextraktes hat eine geringere Mobilität als E_{11} .

6. Vergleich der Komponenten E_{11} , S_c und L_c in der Immunelektrophorese

In der Zonenelektrophorese zeigen die drei Organantigenkomponenten - E_{11} des Myokardextraktes, S_c des Skelettmuskelextraktes und L_c des Lebergewebeextraktes - zwar eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit; in der Immunelektrophorese

erweisen sie sich aber als identisch, da die gegen die Myokardproteine gerichteten Kaninchenantisera mit allen drei Komponenten unter Bildung jeweils einer Präzipitationslinie reagieren.

E. Besprechung der Ergebnisse

Im Serum von zwei Kaninchen, die gegen die Proteingruppe E_{8-11} des menschlichen Herzmuskelextraktes M_1 immunisiert worden waren, fanden sich präzipitierende Antikörper gegen diese vier antigenen Komponenten des menschlichen Myokards. Daneben enthielten diese Seren präzipitierende Antikörper gegen Extraktbestandteile des menschlichen Skelettmuskelgewebes und des menschlichen Lebergewebes.

Eine spezifische Immunreaktion der Kaninchenantisera mit den vier antigenen Komponenten des Herzmuskelextraktes konnte im Rahmen des hier angewendeten Systems nicht nachgewiesen werden.

Bei der Immunelektrophorese mit der Komponente S_C des Skelettmuskelextraktes zeigte sich eine zur Kathode hin doppelt geschweifte Präzipitationslinie, das heißt: die Andeutung einer weiteren Präzipitationslinie in diesem Bereich. Es muß offen bleiben, ob hier kathodisch von S_C eine zusätzliche Komponente liegt, die in der Zonenelektrophorese nicht sichtbar wurde, die aber mit den Kaninchen-Antiherz-Antisera präzipitiert, oder ob die Komponente S_C bei der präparativen Papierelektrophorese nicht vollständig von den übrigen Komponenten getrennt wurde.

Bei der Immunelektrophorese mit der Komponente L_b des Lebergewebeextraktes entstand nur eine Präzipitationslinie, im Gegensatz zu den Präzipitationsmustern der elektrophoretisch entsprechenden Proteingruppen der beiden anderen Organextrakte (E_{9+10} und S_b), wo jeweils zwei Präzipitationslinien zu finden waren. Es läßt sich hier nicht klären, ob die Komponente L_b (L_{b1} und L_{b2}) eine antigene Einheit bildet, oder ob nur ein Teil der Komponente L_b mit den Kaninchen-Antiherz-Antisera reagiert. Im letzteren Fall würde dies bedeuten, daß die untersuchte Leberproteingruppe eine Antigenkomponente beinhaltet, die ausschließlich im menschlichen Lebergewebe vorkommt, aber nicht im menschlichen Herzmuskel und nicht im menschlichen Skelettmuskel.

Es ergibt sich also:

Mit Hilfe der modifizierten Mikroelektrophorese ließen sich Präzipitationsreaktionen zwischen Kaninchenantisera und vier Antigenkomponenten einer elektrophoretisch definierten Gruppe von menschlichen Herzmuskelproteinen darstellen.

Die gegen diese vier Herzmuskelantigene gerichteten Kaninchenantisera zeigten außerdem Kreuzreaktionen mit vier elektrophoretisch gleichartigen Antigenkomponenten des menschlichen Skelettmuskels und mit drei entsprechenden Antigenkomponenten des menschlichen Lebergewebes.

IV. DISKUSSION

In meinen Versuchen wurde eine Gruppe von menschlichen Herzmuskelproteinen mit Hilfe der Immunelektrophorese auf Cellogelelektroden hinsichtlich ihrer Antigenität untersucht. Die Antisera stammten von Kaninchen, die mit der genannten Myokardeiweißgruppe immunisiert worden waren. Diese Proteine bestanden aus vier Antigenkomponenten, die keine Antigen-gemeinschaft mit menschlichen Plasmaproteinen gezeigt hatten.

Mit den Kaninchenantisera konnten Immunpräzipitationen mit den vier Antigenkomponenten des verwendeten Myokardextraktanteils dargestellt werden. Gleichzeitig ergaben die Sera Kreuzreaktionen mit vier Antigenkomponenten aus menschlichem Skelettmuskelextrakt und mit drei Antigenkomponenten aus menschlichem Leberextrakt.

Diese Resultate müssen den Ergebnissen anderer Untersucher gegenübergestellt werden.

Frühere Versuche, organspezifische, insbesondere herzspezifische Antigene bzw. Antikörper nachzuweisen, wurden zunächst an Tieren und mit ganz verschiedenen Nachweismethoden durchgeführt.

Schon 1941 machten HENLE u. Mitarb. (25) den Versuch, in Gewebepartikeln Antigene zu zeigen. Sie fanden mittels Agglutination und Komplementbindungsreaktion in homologen und heterologen Antisera herzspezifische Antikörper gegen Antigene aus hochtourig sedimentierbaren Fraktionen von Kalbs- und Mäuse-

herzextrakten. Im gleichen Jahr wurden von BAILEY und RAFFEL (3) verschiedene Gewebe von Hund und Mensch (u.a. der quergestreifte Muskel und die Leber) untersucht. Der Nachweis von thermostabilen, wasserlöslichen organspezifischen Substanzen in diesen Geweben wurde durch Kaninchenantisera mit Hilfe der passiven Anaphylaxie an Meerschweinchen erbracht. CAVELTI (8) konnte 1947 an Ratten eine Autoantikörperproduktion gegen Rattenherzgewebe erzeugen, indem er die Tiere mit Suspensionen aus Streptokokken und Herzgewebe immunisierte. Ein ähnliches Immunisierungsverfahren verwendete KAPLAN 1958 (29) an Kaninchen. Allerdings erreichte er die Antikörperproduktion bei den Tieren durch Injektion von Streptokokkenkulturen, die in heterologen Säugetierherzmedien (Kalb, Ratte, Mensch) gezüchtet worden waren. Mit der Komplementbindungsreaktion und einem modifizierten Immunfluoreszenztest konnte er spezifische Immunreaktionen der Kaninchensera mit einem Herzgewebebestandteil nachweisen. Ähnliche Versuchsergebnisse erhielt derselbe Autor und seine Mitarbeiter 1962 (33). Durch Immunisierung von Kaninchen mit heterologen Herzgewebekomogenaten von Ratte und Rind konnte eine Antikörperbildung der Kaninchen gegen homologes alkohollösliches Herzantigen hervorgerufen werden.

Als Nachweismethoden dienten Kapillarflockung, Agglutination, Komplementbindungsreaktion und Immunfluoreszenz. Die Antisera richteten sich nicht nur gegen dieses hochtourig sedimentierbare Herzantigen, sondern waren u.a. auch gegen ein Antigen, das Herz- und Skelettmuskel gemeinsam war, gerichtet. Im Gegen-

satz dazu konnten 1961 GERY und DAVIES (18, 19) keine herzspezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mit der Komplementbindungsreaktion zeigen. Die Antisera stammten von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten, die mit heterologen und mit homologen Herzextrakten immunisiert worden waren. Auch andere Techniken wie Latex-Agglutination und passive kutane Anaphylaxie zeigten stets Kreuzreaktionen der Antisera mit verschiedenen Geweben auf (Lunge, Leber, Niere). Lediglich mittels der Hämagglutination mit tannierten Erythrozyten fand sich eine spezifische Antikörperreaktion gegenüber einem salzlöslichen, thermolabilen homologen sowie heterologen Herzantigen. Die Ergebnisse wurden mit Hämagglutinationshemmtesten und Neutralisationstesten untermauert. Da Skelettmuskelextrakt nicht als Gewebsantigen in die Versuche genommen worden war, ist nicht auszuschließen, daß auch bei den zuletzt genannten Methoden Kreuzreaktionen der Sera mit Skelettmuskelantigenen aufgetreten wären.

Die Immundiffusion und die (Immun-)Elektrophorese wurden zur Darstellung von gewebsspezifischen, insbesondere von herzspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen zunächst im Tierexperiment mit ganz unterschiedlichem Erfolg angewandt.

JAFFÉ versuchte 1959 (28) mit Hilfe der Geldiffusion in essigsäuren Extrakten von Kaninchenherzautolysaten ein organspezifisches Antigen zu finden. Die mit dem Kaninchenmyokard spezifisch reagierenden Kaninchenantisera ergaben jedoch auch Kreuzreaktionen mit dem quergestreiften Muskel. Dagegen konnten GERY

und Mitarb. 1960 (17) die Bildung von Antikörpern, die ausschließlich gegen Herzgewebe gerichtet waren, bei Kaninchen hervorrufen. Mittels der Gelpräzipitation - neben der passiven Hämagglutination und der Komplementbindungsreaktion - wiesen sie Antikörper sowohl gegen autologe und homologe als auch gegen heterologe salzige Herzextrakte nach. Dagegen konnten die Autoren 1961 (18) mit der Gelpräzipitation nicht die gleichen Ergebnisse erzielen.

Auch HALBERT und Mitarb. arbeiteten bei der Untersuchung der Antigenität von Säugetiergeweben (Kaninchen, Ratte) mit der Immundiffusion. 1968 zeigten sie (23) am Kaninchen drei autoimmune präzipitierende herzspezifische Systeme. Aber auch HALBERT teilte mit, daß die gegen Herz gerichteten Antikörper ebenso mit anderen Kaninchengeweben reagierten, wenn auch in völlig variabler Weise. 1971 erreichte derselbe Autor (24) durch wiederholte Immunisierung von Kaninchen mit Herzmuskelhomogenaten von Mensch, Ratte und Meerschweinchen wiederum die Bildung von herzwebespezifischen präzipitierenden Antikörpern. Und zwar konnten unter Verwendung des Gesamtantiserums und salziger Kaninchenherzextrakte fünf präzipitierende Systeme sichtbar gemacht werden. Wenn aber Immunglobulinkonzentrate von Kaninchen-Antikaninchenherz-Antisera verwendet wurden und Ammoniumsulfatkonzentrate von Kaninchenherzextrakten die Testantigene darstellten, dann konnten sogar bis zu 6 bis 7 Immunsysteme festgestellt werden. Unter den gleichen Versuchsbedingungen immunisierte HALBERT eine Gruppe von Sprague-Dawley-Ratten, beobachtete hier aber lediglich vier präzipitierende Immunsysteme.

Einige der Kaninchenantisera reagierten außer mit dem Herzgewebe auch mit anderen Kaninchengeweben, aber die Absorption der Sera mit diesen Geweben zeigte deutlich, daß einige der Antigene, die in dem Herzpräzipitationsmuster nachweisbar waren, in Skelettmuskel, Leber und weiteren untersuchten Organen nicht auffindbar waren. Im Gegensatz zu HALBERT gelang 1973 SHULMAN und CENTENO (45) über zahlreiche Arbeitsgänge (Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Gelfiltration mit Sephadex, Dialyse gegen aqua dest., Chromatographie) zwar die Reindarstellung eines Gewebeantigens beim Kaninchen, aber nicht der Nachweis seiner Organspezifität. Die Kaninchen, die mit einem Nebennierenrindenextrakt immunisiert worden waren, produzierten Antikörper gegen dieses Antigen, das außer aus dem Herzen auch aus anderen Organen (Nebenniere, Leber, Niere) isoliert wurde. Als immunologische Nachweisttechnik wurden die Elektrophorese und die Gelpräzipitation herangezogen.

Die Antigenität des menschlichen Myokards wurde erst in jüngerer Zeit mit Hilfe der (Immun-)Diffusionstechnik und der (Immun-)Elektrophorese untersucht.

BJÖRKLUND verwendete 1956 (5) eine modifizierte Gel-diffusionstechnik. Er fand, daß das Hyperimmunserum eines Pferdes, welches mit verschiedenen Karzinomgeweben vom Menschen behandelt worden war, mit vier Antigenen - eindeutig geweblichen Ursprungs - reagierte. Diese Antigene konnten immunologisch nicht nur verschiedenen Tumorgeweben zugeordnet werden, sondern auch mehreren nicht pathologisch veränderten

menschlichen Geweben, u.a. dem menschlichen Herzgewebe, Skelettmuskelgewebe und Lebergewebe. Eben-
sowenig gelang es KUSHNER und KAPLAN 1967 (36), mit
Hilfe von Ziegenantisera, die gegen menschliche
Herzhomogenate gerichtet waren, das Vorhandensein
von herzspezifischen Antigenen in salzigen Herzex-
trakten des Menschen unter Verwendung der Immundif-
fusion in Agar und der Immunelektrophorese sichtbar
zu machen. Die Antisera bildeten mit zwei Antigenen
aus den Herzextrakten Präzipitationen. Eines dieser
Antigene wurde gleichzeitig in der Niere gefunden,
das andere gleichzeitig im Skelettmuskel und wurde
später als Myoglobin identifiziert.

1968 verwendeten ESPINOSA und KAPLAN (14) außer der
Immundiffusion auch die Immunfluoreszenz. Sie führ-
ten eine Immunisierung von Kaninchen mit sauren
menschlichen Herzextrakten durch und entdeckten, daß
diese Antisera gegen zwei relativ thermolabile anti-
gene Komponenten gerichtet waren, die im menschi-
chen Myokard und im menschlichen Skelettmuskel glei-
chermaßen vorhanden waren. Zur gleichen Zeit unter-
suchten HAGERT und Mitarb. (22) die unterschiedli-
che Antigenität von verschiedenen Anteilen des
menschlichen Herzens (Herzklappen-, Herzmuskel- und
Herzbeutelgewebe). Sie immunisierten Kaninchen mit
Bestandteilen salziger Herzextrakte des Menschen.
Mit der von GRABAR und WILLIAMS (20) beschriebenen
Immunelektrophorese stellten sie keine unterschied-
lichen Immunreaktionen der Antisera mit den verschie-
denen Herzgewebeanteilen fest. Erst durch die Kombi-
nation von Elektrophorese und Geldiffusion nach
OUCHTERLONY (41) war es ihnen möglich, weitere Dif-

ferenzierungen der Antigen-Antikörper-Reaktionen vorzunehmen. So wiesen die Autoren zwar nach, daß das menschliche Herz immunologisch keine Einheit darstellt, da sie aber keine Vergleiche mit anderem menschlichen Organgewebe durchführten, mußte eine Organspezifität der beschriebenen Immunreaktionen dahingestellt bleiben.

Erst 1970 (und 1971) gelang es ESPINOSA und KAPLAN (15, 16), eine immunspezifische Reaktion zwischen einer Antigenkomponente des menschlichen Myokards und Kaninchen-Antiherz-Antisera darzustellen. Die Kaninchen waren mit einer chromatographisch gewonnenen, salzlöslichen Fraktion des menschlichen Herzmuskels immunisiert worden. Mit Hilfe der Doppeldiffusion in Agarose und der Mikroelektrophorese nach SCHEIDEGGER (44) wurden die Kaninchensera und saure, sowie salzige, Herzextrakte des Menschen der immunchemischen Untersuchung unterzogen. Mit Hilfe dieser Methoden, in Kombination mit spezifischen Absorptionstesten, konnte gezeigt werden, daß die Kaninchenantisera spezifisch mit einem Herzantigen reagierten, das sowohl in sauren als auch in salzigen Herzextrakten gefunden wurde. Daneben wurde eine Antikörperreaktion mit gemeinsamen antigenen Bestandteilen salziger Waschlösungen von menschlichen Herzmuskel- und Skelettmuskelextrakten dargestellt.

Die Versuchsergebnisse der verschiedenen Autoren zeigen, daß die Produktion herzspezifischer Antikörper, und somit der Nachweis herzspezifischer Antigene, von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Das sind hauptsächlich: Herkunft, Aufbereitungs-

art und Reinheitsgrad des Antigens; Spezieszugehörigkeit und Immunisierungsmodus des Antiserumspenders, sowie Spezifität und Empfindlichkeit der gewählten immunologischen Nachweisttechnik. Eine besondere Schwierigkeit bei der Gewinnung spezifischer Herzmuskelantigene aus menschlichem Myokard stellt u.ä. ihre technische Trennung von den Plasmaproteinen dar, die kaum vollständig aus dem Organ entfernt werden können. BACHMANN (2) versuchte, dieses Problem durch Absorption der störenden Proteine mit entsprechenden Antiseren zu lösen. Es gelang nur teilweise. Erfolgreicher war die Methode von NOWY (39), solche Plasmaproteinverunreinigungen schon bei der Isolierung der Organantigene zu eliminieren. Die ausgewählte Proteingruppe der Herzmuskelextrakte bot sich an, weil ihre Trennung von den immunologisch entsprechenden Plasmaproteinen (Gammaglobulinfraktion) durch die Kombination von präparativer Elektrophorese und Gelchromatographie auf verhältnismäßig einfache Weise möglich war.

Eine weitere Schwierigkeit tritt bei dem Versuch auf, beispielsweise in einem Patientenserum, Herzmuskeleiweiß mit Hilfe eines entsprechenden Antiserums nachzuweisen, da eine immunologische Verwandtschaft zwischen manchen Myokard- und Serumproteinen besteht. (NOWY 38). Eine solche besteht sicher zwischen Serumalbumin und Myalbumin (Komponente 1), sowie zwischen Transferrin und einem Bestandteil der Komponente 4, wahrscheinlich auch zwischen α_1 -Antitrypsin und einem Bestandteil der Komponente 2. Die Komponenten 8-11 des Myokardextraktes ergaben keine Kreuzreaktion mit Serumeiweißkörpern.

Das größte Problem in diesem Zusammenhang ergibt sich aber sicher aus der Verwandtschaft bzw. Identität mancher Herzmuskelproteine mit Proteinen anderer Organe, da die Sarkoplasmaproteine zum größten Teil Enzymeiweiß darstellen. Aufgrund bisheriger Untersuchungen (39) scheidet die Komponente 11 als herzspezifisches Antigen aus, da sie neben Komponente 3 die größte GOT-Aktivität enthält. Mit Hilfe der hier beschriebenen Methoden wurden ebenfalls Kreuzreaktionen zwischen Komponente 11 und antigenen Anteilen des Lebergewebes und des Skelettmuskelgewebes festgestellt. Dasselbe gilt für die Komponente 7/8, in deren elektrophoretischem Bereich ein CPK-Isoenzym liegt, das im Herz- und Skelettmuskel vorkommt (40). Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich ebenfalls eine Antigengemeinschaft der Komponente 8, aber auch der Komponenten 9 und 10 des Myokardextraktes sowohl mit Proteinen des menschlichen Skelettmuskels als auch mit Proteinen des menschlichen Lebergewebes.

Die technischen Schwierigkeiten, die sich bei der Erarbeitung der mikroelektrophoretischen Methode ergaben, waren hauptsächlich folgende:

Bei Anwendung der üblichen Technik der Mikroelektrophorese in Barbituratpuffer (mit Geräten der Fa. Beckmann) wanderten die Immunpräzipitate kaum von der Auftragstelle der Organextrakte in Richtung Anode und es entstand ein unübersichtliches Konglomerat von Linien. Ein wesentlich besseres Ergebnis wurde durch Verwendung des Tris-ADTA-Borsäure-Puffers nach ARRONSON und GRÜNWALL (1) erzielt, sowie durch Er-

höhung der Spannung von 140 auf 200 Volt, und durch Änderung der Wanderungszeit von 55 Minuten auf 4 Stunden. Damit wurde erreicht, daß die Präzipitationslinien von dem Auftragspunkt der Extrakte in Richtung Anode wanderten und über eine längere Strecke verteilt angeordnet lagen, so daß mehr Linien sichtbar wurden und leichter differenziert werden konnten.

Schließlich war ein wesentliches Problem dadurch entstanden, daß die Präzipitationslinien zunächst schlecht sichtbar waren und gerne mit der Auftraglinie des Antiserums verschwammen. Dies konnte weitgehend durch Variation der Antiserummenge (zwischen $70\mu\text{l}$ und über $100\mu\text{l}$) und der Auftrageart des Antiserums gelöst werden (z.B. Auftragen des Antiserums mit dem einfachen Baumwollfaden, mit einer Kunststoffpipette entlang einem Lineal oder mit einem Filterpapierstreifen). Als optimal erwies sich eine Antiserummenge von $100\mu\text{l}$, aufgetragen mittels des doppelt genommenen Baumwollgarnfadens. Auf diese Weise erhielt ich deutliche, scharf und gleichmäßig gezeichnete Präzipitationslinien, die klar getrennt von der Auftraglinie des Antiserums lagen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antigenität eines Anteils des menschlichen Herzmuskels mit Hilfe der Immunelektrophorese unter Verwendung von Kaninchenantisera untersucht. Hierzu stand eine Gruppe von vier Antigenkomponenten, E₈₋₁₁, aus menschlichem Myokard zur Verfügung. Diese vier Komponenten wurden mittels der Zonenelektrophorese charakterisiert, wonach sie sich im gleichen elektrophoretischen Mobilitätsbereich befinden wie die Gammaglobulinfraktion des menschlichen Normalserums. Die Antisera stammten von Kaninchen, die mit einem Gemisch aus den vier menschlichen Herzmuskelantigenen E₈₋₁₁ immunisiert worden waren. Als immunelektrophoretische Methode wurde ein Mikroverfahren auf Cellogelstreifen gewählt und modifiziert.

Um Kreuzreaktionen der Herzmuskelproteine mit Proteinen anderer Organe auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurden in gleicher Weise Bestandteile aus menschlichem Skelettmuskelextrakt und menschlichem Leberextrakt untersucht. Die Organextrakte wurden gewonnen, aufbereitet und mittels der präparativen Papierelektrophorese aufgetrennt. Für die vergleichende Immunelektrophorese wurden von beiden Organen die Antigenkomponenten verwendet, die zonenelektrophoretisch im gleichen Mobilitätsbereich lagen wie die Antigenkomponenten E₈₋₁₁ des Myokardextraktes.

Bei der Immunelektrophorese zeigte es sich, daß die Kaninchenantisera, die mit den vier Herzmuskelkompo-

nenten Immunpräzipitate bildeten, ebenso mit vier Antigenkomponenten des menschlichen Skelettmuskels und mit drei Antigenkomponenten des menschlichen Lebergewebes kreuzreagierten.

Das Präzipitationsmuster des Skelettmuskelextraktes gab einen Hinweis auf das Vorhandensein einer fünften gemeinsamen Antigenkomponente in den untersuchten Herz- und Skelettmuskelfractionen.

Die Untersuchungsergebnisse am Leberextrakt legten die Annahme der Existenz einer Antigenkomponente in der Leberextraktfraktion nahe, die weder im Herzmuskel noch im Skelettmuskel vorkommt.

Die hier gewählte Methode der modifizierten Mikroelektrophorese hat den Vorteil eines zeitlich und technisch relativ geringen Aufwandes. Die Versuchsergebnisse zeigen jedoch, daß diese Methode eine endgültige Charakterisierung und Identifizierung der dargestellten Organantigene nicht zuläßt; sie können aber den Weg für weitere differenziertere Untersuchungen weisen.

Das Ziel solcher Untersuchungen ist es, den Nachweis von - infolge Erkrankung - ins Plasma übergetretener herzspezifischer Substanzen mit Hilfe eines geeigneten Antiserums zuerbringen. Diese Nachweismöglichkeit wäre im Hinblick auf die Diagnostik des Myokardfarkts von besonderem Interesse.

Literaturverzeichnis

- 1) ARRONSON, T., A. GRÖNWALL
Improved Separation of Serum Proteins in
Paper Electrophoresis - a New Electro-
phoresis Buffer.
Scand. J. Clin. Invest. 9, 338-341 (1957)
- 2) BACHMANN, G.W.
Immunochemische Untersuchungen myokardialer
Antigene des Menschen.
Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch. 36, 324-326 (1970)
- 3) BAILEY, H., M.D. and S. RAFFEL
Organspecificity of Tissues of the Dog and Man
as Shown by Passive Anaphylaxis in Guinea Pigs.
J. Exp. Med. 73, 617-628 (1941)
- 4) BENEZRA, D., I. GERY, A.M. DAVIES
Specificity of Blast Transformation.
Species - Specific Antigens.
Int. Arch. Allergy 39, 479-487 (1970)
- 5) BJÖRKLUND, B.
Antigenicity of Malignant and Normal Human
Tissue by Geldiffusion Techniques.
Int. Arch. Allergy, 8, 179-192 (1956)
- 6) BROKMAN, H., BRILL, J. FRENZEL
Komplementablenkung mit Organextrakten von
Rheumatikern - BBF-Reaktion - bei sogenanntem
akuten Gelenkrheumatismus.
Klin. Wschr. 16, 502-503 (1937)

7) CAVELTI, P.A.

Autoantibodies in Rheumatic Fever.

Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 60, 379-381 (1945)

8) CAVELTI, P.A.

Studies of the Pathogenesis of Rheumatic Fever.

II. Cardiac Lesions Produced in Rats by Means
of Autoantibodies of Heart and Connective Tissue.

Arch.Path. 44:1, 13-27 (1947)

9) CLAUSEN, J.

Immunochemical Techniques for the Identification
and Estimation of Macromolecules.

North-Holland Publishing Comp., Amsterdam,
London (1969)

10) DAVIES, A.M., M.D. and I. GERY

The Role of Autoantibodies in Heart Disease.

Am. Heart Journal 60, 669-674 (1960)

11) DORNBUSCH, S.

The Value of Gel-Precipitation Method for
the Study of Autoimmunological Problems.

Int.Arch. Allergy 11, 206-213 (1957)

12) DRESSLER, W.

The Post-Myocardial Infarction Syndrome.

Arch.Int.Med. 103, 28-42 (1959)

13) EHRENFELD, E.N., I. GERY, A.M. DAVIES

Specific Autoantibodies in Heart Disease.

The Lancet 1, 1138-1141 (1961)

- 14) ESPINOSA, E. M.H. KAPLAN
Antigenic Analysis of Human Heart Tissue:
Identification of Antigens with Specificity
Restricted to Heart and Skeletal Muscle in
Acid Extracts of Myocardium.
J. Immunol. 100, 1020-1031 (1968)
- 15) ESPINOSA, E., M.H. KAPLAN
Antigenic Analysis of Human Heart Tissue,
Antigens with Restricted Organ-Distribution
on Acid Extracts of Human Myocardium.
J. Immunol. 105, 416-425 (1970)
- 16) ESPINOSA, E., M.H. KAPLAN
Antigenic Analysis of Human Heart Tissue.
Further Characterization of an Organ Specific
Antigen of Heart Tissue.
J. Immunol. 106, 611-618 (1971)
- 17) GERY, I., A.M. DAVIS, E.N. EHRENFELD
Heartspecific Autoantibodies.
The Lancet 1, 471-472 (1960)
- 18) GERY, I., A.M. DAVIES
I. Animal Immunisation with Heterologous Heart.
J. Immunol. 87, 351-356 (1961)
- 19) GERY, I., A.M. DAVIES
II. Immunisation of Rabbits with Homologous Heart.
J. Immunol. 87, 357-361 (1961)
- 20) GRABAR, P., C.A. WILLIAMS
Méthode Permettant l'Etude Conjugée des
Propriétés Electrophorétiques et Immunochimiques
d'un Mélange de Protéines.
Application au Sérum Sanguin.
Biochim. biophys. Acta 10, 193-194 (1953)

- 21) GRASSMANN, W., K. HANNIG, M. KNEDEL
über ein Verfahren zur elektrophoretischen
Bestimmung der Serumproteine auf Filterpapier.
Dtsch.med.Wschr. 76, 333-336 (1951)
- 22) HAGERT, M., H. TRENCKMANN, C. HAGERT
Experimentelle Untersuchungen über die Antigen-
struktur des menschlichen Herzens mittels
Immunelektrophorese.
Zschr.inn.Med. 23:19, 596-600 (1968)
- 23) HALBERT, S.P., S.E. HOLM, A. THOMPSON
Cardiac Autoantibodies. I. Immunodiffusion
Analysis of Multiple Responses Evoked
Homologously and Heterologously.
J.exp.Med. 127, 613-631 (1968)
- 24) HALBERT, S.P.
The Cardiac Autoimmune System.
Int.Arch. Allergy 41, 117-121 (1971)
- 25) HENLE, W., L.A. CHAMBERS, V. GROUPE
The Serological Particulate Components
Derived from Various Normal Mammalian Organs.
J. exp.Med. 74, 495-510 (1941)
- 26) HUCZEK-GLEBOCKI, J., W. PIOTROWSKI, E. SWIECICKI
Serum Antibody Quantitative Determination in
Myocardial Infarction.
Am. Immunol. III, 1-2, 69-74 (1971)
- 27) HUMPHREY, J.H., R.G. WHITE
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1972)

- 28) JAFFÉ, R., W. JAFFÉ, C. KOZMA
Experimentelle Herzveränderungen durch
organspezifische Auto-Antikörper.
Frankfurt, Z.Path. 70, 235-245 (1959)
- 29) KAPLAN, M.H.
Immunologic Studies of Heart Tissue.
II. Production in Rabbits of Antibodies
Reactive with an Autologous Myocardial
Antigen, Following Immunization with
Heterologous Heart Tissue.
J. Immunol. 80, 254-267 (1958)
- 30) KAPLAN, M.H.
Antibodies to Heart Tissue in the Sera of
Certain Patients with Rheumatic Fever.
Fed.Proc. 18, 576-576 (1959)
- 31) KAPLAN, M.H.
The Concept of Autoantibodies in Rheumatic
Fever and in Postcommisurotomy State.
Am. N.Y. Acad. Sci. 86, 974-991 (1960)
- 32) KAPLAN, M.H., M. MEYSERIAN, J. KUSHNER
Immunological Studies of Heart Tissue:
IV. Serological Reactions with Human Heart
Tissue as Revealed by Immunfluorescent Methods:
Isoimmune, Wasserman and Autoimmune Reactions.
J.exp.Med. 113, 17-35 (1961)
- 33) KAPLAN, M.H., M. MEYSERIAN, J. KUSHNER
Immunological Studies of Heart Tissue:
V. Antigens related to Heart Tissue Revealed
by Cross-Reactions of Rabbit-Antisera to
Heterologous Heart.
J.Immunol. 88, 450-461 (1962)

- 34) KLEINSORGE, A., S. DORNBUSCH

Über das Vorkommen eines Serumfaktors
mit Autoantikörpereigenschaften beim
Herzinfarkt.

Klin.Wschr. 28, 970-973 (1960)

- 35) KOHN, J.

A Cellulose Acetat Supporting Medium
for Zone Electrophoresis.

Clin. chim. Acta 2, 297-303 (1957)

- 36) KUSHNER, J., M.H. KAPLAN

Antigenic Analysis of Extracts of Human Heart
Tissue: Cardiac Antigens with Limited
Distribution in Other Organs.

J. Immunol. 99, 526-533 (1967)

- 37) LEIDL, F.J.

Farbstoffbindung an Herzmuskeleiweiß.

Dissertation, München 1969

- 38) NOWY, H.

Zur Stoffbindung an Organeiweiß

Verh.Dtsch.Ges.Inn. Med. 73, 809-812 (1967)

- 39) NOWY, H.

An Antiserum Against a Group of Human
Myocardial Proteins.

Actas del VI Congreso Europeo de Cardiologia,
Madrid, 1143-1145 (1972)

- 40) NOWY, H.

Unveröffentlichte Untersuchungsergebnisse.

41) OUCHTERLONY, Ø.

In Vitro Method for Testing the Toxin-Producing Capacity of Diphtheria Bacteria.

Act.Pathol.Microbiol.Scand. 25, 186-191 (1948)

42) POLZER, K., C. STEFFEN

Weitere Untersuchungen über die klinische Verwendbarkeit des Anti-Globulin-Konsumptions-Testes bei Rheumatischen Herzerkrankungen und Vergleich der Konsumptionsergebnisse mit den Resultaten anderer Laboratoriumsmethoden.

Klin.Wschr. 36, 211-218 (1958)

43) REJHOLEC, V., WAGNER, V.

Antimyocardial Antibodies in Rheumatic Fever.

Experientia (Basel) 11, 278-278 (1955)

44) SCHEIDEgger, J.J.

Une Micro-Méthode de l'Immuno-Electrophorèse

Int.Arch.Allergy 7, 103-110 (1955)

45) SHULMAN, S., E.R. CENTENO

Isolation and Characterization of a Rabbit Non-Tissue Specific Autoantigen which is Shared by Kidney, Heart, Adrenal and Liver.

Immunology 24, 925-937 (1973)

46) STEFFEN, C.

Allgemeine und experimentelle Immunpathologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)

47) TAGG, J.R., A.R. Mc.GIVEN

Myoid Cell Antibodies in Rheumatic Fever.

Immunological Communications 2 (2), 227-230 (1973)

48) THOMPSON, A., S.P. HALBERT

The Cardiac Autoimmunesystem. III. Studies on the Cytotoxicity of Heart Antibodies for Pulsating Rabbit and Rat Heart Cells in Tissue Culture.

Int.Arch. Allergy 40, 274-286 (1971)

Mein besonderer Dank gilt Herrn
Prof. Dr. H. Nowy für die Über-
lassung des Themas sowie seine
Anregungen und stetige Unter-
stützung bei der Durchführung
und Fertigstellung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Krülle
für ihre überaus freundliche Hilfe
bei der praktischen Gestaltung
der Arbeit.

Lebenslauf

Am 6. April 1945 wurde ich, Dagmar Lieselotte van Thiel, als drittes Kind des Universitätsdozenten Prof. Dr. Hans van Thiel und der Zahnärztin Dr. Annalise van Thiel geb. Gräfin in Ernstthal/Thür. geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1951 bis 1955 in Runderoth/Rhld. 1955 wurde ich in die erste Klasse des Realgymnasiums in Gräfelfing/Obb. aufgenommen und legte dort im Jahre 1964 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1964/65 begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Medizin, das ich dort im Juni 1970 mit der ärztlichen Prüfung beendete. Nach Abschluß der Medizinalassistentenzeit erhielt ich im Februar 1972 die Approbation als Arzt.

Im April 1972 nahm ich die Stelle einer wissenschaftlich angestellten Ärztin in der Bayerischen Landesimpfanstalt an und wurde während meiner dortigen Tätigkeit im November 1974 in den Beamtenstand auf Probe berufen.

